

Das Verhalten der Erythrozytenisoenzyme
der Adenosindeaminase, Adenylatkinase,
Phosphoglukomutase
und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
unter cytostatischer Behandlung

von
Uta Weiskopf
—
aus
Kulmbach

1979

1080 W 156



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546211_0102

Aus der Klinik für Kinderheilkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg
ehem. Direktor: Professor Dr. med. A. Windorfer

Das Verhalten der Erythrozytenisoenzyme
der Adenosindeaminase, Adenylatkinase,
Phosphoglukomutase
und 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
unter cytostatischer Behandlung

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Uta Weiskopf

aus

Kulmbach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg

Dekan: Prof. Dr.W. Kersten

Referent: Prof. Dr. F. C. Sitzmann

Korreferent: Prof. Dr. A. Windorfer

Tag der mündlichen Prüfung: 17.12.1979



	Seite
I. Einleitung	2
II. Untersuchungsgut	4
III. Charakteristik vier untersuchter Erythrozytenenzyme	7
IV. Methodik der Isoenzymauftrennung	19
1. Herstellung der Hämolysate	19
2. Darstellung der Isoenzymmuster mittels CAF-Elektrophorese	20
3. Einzelheiten zu den verschiedenen Isoenzym-Darstellungen	25
V. Ergebnisse eigener Untersuchungen	33
1. Berechnung der Genfrequenzen	33
2. Genfrequenztabelle	40
3. Vergleich der Genfrequenzen mit Genfrequenzen bei "gesunden" Probanden	46
4. Irreguläre Isoenzymmuster	49
VI. Diskussion	56
1. Interpretation der gefundenen Genfrequenzen	56
2. Diskussion der atypischen Varianten	62
3. Beantwortung der Fragestellung	70
VII. Zusammenfassung	71
VIII. Literaturverzeichnis	72

I. Einleitung

Die genetisch gesteuerten Polymorphismen der Erythrozytenenzyme haben in der Populationsgenetik und in der forensischen Serologie Bedeutung erlangt. Durch die Entwicklung der Cellulose-Acetatfolien-Elektrophorese (CAF) wurde die Darstellung der verschiedenen Enzymsysteme wesentlich vereinfacht. Inzwischen hat man in vielen Gebieten der Erde Genfrequenzanalysen für Erythrozytenenzyme durchgeführt.

Im Rahmen eines solchen Genfrequenzuntersuchungsprogramms an der Kinderklinik der Universität Erlangen fand man bei der Auftrennung der Isoenzyme der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase eine atypische sogenannte Richmond-Variante (19) . Die Blutprobe stammte von einer Patientin in Westungarn, die wegen Lymphogranulomatose zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter cytostatischer Behandlung gestanden hatte. Auch bei anderen cytostatisch behandelten Patienten fielen wiederholt atypische Bandenmuster auf, die sich zum Teil reproduzieren ließen.

Diese Befunde gaben Anlaß zu folgenden Fragestellungen:

1. Treten bei Patienten, die an bösartigen Neubildungen erkrankt sind, gehäuft ungewöhnliche Isoenzymmuster der Erythrozytenenzyme auf ?

Kann man hierbei Unterschiede zwischen cytostatisch behandelten Patienten und nicht cytostatisch behandelten Kranken feststellen ?

2. Bestehen Unterschiede hinsichtlich der Genfrequenzen bei den Erythrozyten-isoenzymen zwischen gesunden Probanden und Patienten, die an bösartigen Neubildungen leiden ?

In der vorliegenden Arbeit wird versucht, diese Fragen zu beantworten. Dazu wurden mittels Cellulose-Azetatfolien-Elektrophorese die Isoenzymmuster der Adenosindeaminase, der Adenylatkinase, der Phosphoglukomutase und der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase in den Erythrozyten von solchen Patienten untersucht, die an bösartigen Neubildungen erkrankt waren.

II. Untersuchungsgut

Von den insgesamt 383 Blutproben kamen 171 aus Franken und 212 aus Westungarn. Es konnten nicht alle Proben auf sämtliche vier Enzyme hin untersucht werden; dadurch ergaben sich bei den einzelnen Enzymen unterschiedliche Probandenzahlen, die in Tabelle 1 angegeben sind.

Tab. 1: Anzahl der Blutproben aus Franken und Westungarn für die vier untersuchten Enzyme

	ADA	AK	PGM	6-PGD
Franken	169	156	164	169
Westungarn	212	201	212	212
Gesamtzahl	381	357	376	381

Die Blutproben aus Westungarn wurden uns von Herrn Prof. Dr. Lajos István, dem Ärztlichen Direktor der Bluttransfusionszentrale in Szombathely, zur Verfügung gestellt. Sie stammten von Patienten aller Altersstufen, die an Morbus Hodgkin (Lymphogranulomatosis maligna Paltauf-Sternberg) erkrankt waren und zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter cytostatischer Behandlung standen. Die Blutproben kamen in zehn Sendungen im Zeitraum von Februar 1976 bis Juli 1977 per Eilpost nach Erlangen, nachdem sie an der österreich-ungarischen Grenze direkt übergeben worden waren.

So konnten sie innerhalb einer Woche nach Blutentnahme aufgearbeitet werden.

Die Blutproben aus Franken stammten von Kindern und Jugendlichen aus dem Einzugsgebiet der Universitäts-Kinderklinik Erlangen, die wegen ihrer Erkrankung größtenteils ambulant behandelt wurden. Die Proben wurden in der poliklinischen Sprechstunde gesammelt und im Durchschnitt innerhalb von zwei Wochen nach Entnahme bearbeitet.

32 Kinder litten an Lymphogranulomatose, 58 Kinder an akuter Lymphoblasten-Leukämie (ALL) und weitere 60 Kinder an anderen bösartigen Neubildungen, z. B. Wilms-tumoren und Neuroblastomen. 12 Kinder kamen zur Durchuntersuchung, weitere 9 Kinder litten an anderen, nicht neoplastischen Erkrankungen.

81 Kinder standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter cytostatischer Behandlung mit verschiedenen Medikamenten, wie Cyclophosphamid, Vincristin, Methotrexat und Mercaptopurin. Bei einigen Kindern wurde auch eine Kombinationsbehandlung aus mehreren Cytostatika und teilweise zusätzlich Prednisolon durchgeführt.

Bei 22 Kindern war nicht angegeben, ob sie bei der Blutentnahme cytostatisch behandelt waren. 68 Kinder standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht unter cytostatischer

Therapie; es handelte sich um ein
therapiefreies Intervall.

Tabelle 2 zeigt das Untersuchungsgut
der Probanden aus Franken und West-
ungarn nach Diagnose geordnet:

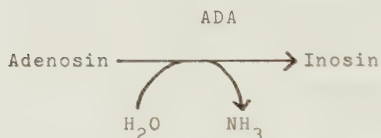
Tab. 2

	Franken	Westungarn
Lymphogranulomatose	32	212
ALL	58	
andere Malignome	60	
Durchuntersuchung	12	
nicht-neoplast. Erkrankg.	9	
Gesamtzahl	171	212

III. Charakteristik der vier unter- suchten Erythrozytenenzyme

1. Adenosindeaminase: ADA (E.C.3.5.4.4)

Die ADA ist eine Aminohydrolase. Sie katalysiert beim Abbau der Purinbasen die Deaminierung des Adenosins zu Inosin (46) :



Spencer, Hopkinson und Harris stellten 1968 individuelle Unterschiede bei den Isoenzymen der Adenosindeaminase fest. Man fand zunächst drei Phänotypen. Durch populationsgenetische Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß das Merkmal durch zwei allele Gene an einem autosomalen Locus bestimmt wird, die kodominant vererbt werden (58) . Die homozygoten Typen nannte man ADA 1 (ADA 1/ADA 1) bzw. ADA 2 (ADA 2/ADA 2) , den heterozygoten Typ entsprechend ADA 2-1 (ADA 2/ADA 1) . Später wurden noch weitere Phänotypen gefunden, die man auf das Wirken eigener, sehr seltener Gene zurückführte. Diese kommen in heterozygoter Form zusammen mit den Normgenen vor. Bis jetzt sind die Typen ADA 3-1, ADA 4-1, ADA 5-1, ADA 5-2

und ADA 6-1 elektrophoretisch nachgewiesen worden (12,13,23,44,47) .
Auch die Existenz eines "stummen" Gens ADA 0 muß angenommen werden (44) .

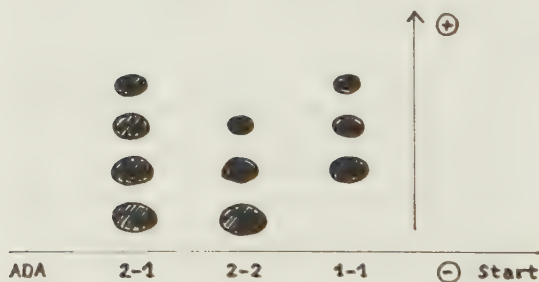
Die Genfrequenzen für ADA 1 liegen in Deutschland zwischen 0.935 und 0.962, für ADA 2 zwischen 0.064 und 0.038 (1; 20) .

Bei der hier angewandten Methode zeigen die homozygoten Phänotypen der ADA jeweils drei Enzymbanden, die zur Anode hin schwächer werden. Die Isoenzyme vom Typ ADA 1 wandern schneller und sind daher gegenüber denen des Typs ADA 2 um eine Bande in Richtung Anode verschoben. Der Typ ADA 2-1 zeigt vier Enzymbanden, die sich durch Überlagerung der beiden Muster der homozygoten Formen ergeben (52) .

Die beschriebenen Isoenzymmuster der ADA lassen sich nur an frischen Hämolysaten darstellen. Die ADA-Isoenzyme besitzen freie, reaktionsbereite SH-Gruppen, die mit oxidiertem Glutathion reagieren können, welches sich bei der Lagerung in den Hämolysaten anreichert (27, 28, 58) . Hierdurch wird die elektrische Ladung und damit die Motilität der Isoenzyme beeinflusst, und es entstehen Enzymmuster, die von den oben beschriebenen abweichen. Die am meisten kathodisch gelegenen Isoenzyme verlieren an Aktivität, liefern also schwächere Enzymbanden. Die weiter anodisch gelegenen Isoenzyme stellen sich

in älteren Hämolysaten stärker dar.
Dieses Verhalten kann zu Fehlinterpretationen der Isoenzymmuster führen, vor allem dann, wenn man gleichzeitig frische und ältere Proben bearbeitet (27, 28, 46, 54, 58) . Die Veränderungen lassen sich vermeiden oder rückgängig machen, indem man den Hämolysaten 2-Mercaptoäthanol beigibt (54) .

Schematische Darstellung der wichtigsten ADA-Phänotypen:



2. Adenylatkinase: AK (E.C. 2.7.4.3)

Die AK katalysiert als Phosphotransferase folgende Reaktion:

AK



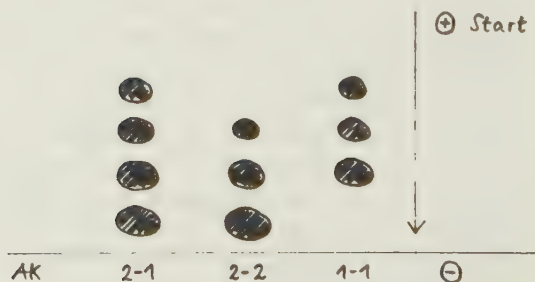
Sie ist ein wichtiges Enzym im Energiestoffwechsel. Beim Menschen findet man die AK außer in den Erythrozyten auch im Muskelgewebe, Leber und Thrombozyten in hoher Konzentration (19).

1966 entdeckten Fildes und Harris mittels Stärkegelelektrophorese in Hämolysaten menschlicher Erythrozyten unterschiedliche Enzymmuster der AK (16). Durch Familien- und Populationsuntersuchungen wurde belegt, daß dieser Enzympolymorphismus genetisch bedingt ist. Man nimmt zwei kodominante autosomale Allele AK 1 und AK 2 an (56), es ergeben sich die drei Phänotypen AK 1 (AK1/AK1), AK 1-2 (AK1/AK2) und AK 2 (AK2/AK2). Später wurden noch weitere, sehr seltene Phänotypen gefunden (5, 42, 45), die man mit AK 3-1 und AK 4-1 bezeichnet und als heterozygote Formen des am meisten verbreiteten Gens AK 1 und der seltenen Gene AK 3 bzw. AK 4 erklärt. Einige Fälle mit verminderter AK-Aktivität lassen die Existenz eines stummen Allels AK 0 vermuten, das zusammen mit den Normgenen AK 1 bzw. AK 2 in heterozygoter Form auftritt (51, 60). Die Genfrequenzen für AK 1 liegen in Deutschland zwischen 0,95 und 0,97, für AK 2 zwischen 0,03 und 0,05 (1, 52).

Man unterscheidet heute drei strukturelle Genloci AK 1, AK 2 und AK 3 (65) in menschlichen Geweben. Der Locus AK 1 ist eng gekoppelt mit dem Genlocus für das ABO-Blutgruppen-System (45) . In menschlichen Erythrozyten-Hämolysaten sind jedoch nur die AK 1-Isoenzyme nachweisbar (65) . Sie wandern bei der hier angewandten Methode im elektrischen Feld kathodisch. Die homozygoten Phänotypen AK 1-1 und AK 2-2 bilden jeweils drei Enzymbanden, die zur Anode hin stark an Intensität abnehmen. Die Isoenzymbanden des Typs AK 2-2 wandern schneller als die vom Typ AK 1-1 und sind deshalb diesen gegenüber um eine Bande zur Kathode hin verschoben. Der Typ AK 2-1 stellt eine Mischung aus den homozygoten Typen AK 1-1 und AK 2-2 dar und besitzt daher vier Enzymbanden mit jeweils halber Intensität.

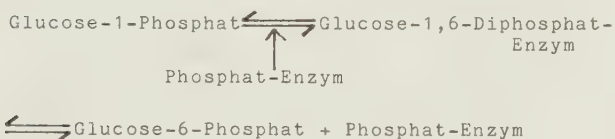
Abhängig vom pH-Wert und Konzentration des Elektrophoresepuffers läßt sich mittels Cellulose-Acetatfolien-Elektrophorese die am weitesten kathodisch gelegene Bande beim Typ AK 2-2 und AK 2-1 in zwei Enzymbanden auftrennen (54).

Schematische Darstellung der wichtigsten AK-Phänotypen:



3. Phosphoglucomutase: PGM (E.C. 2.7.5.1)

Die PGM, ein wichtiges Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels, katalysiert die reversible Umwandlung von Glucose-1-Phosphat in Glucose-6-Phosphat. Dabei liegt sie abwechselnd als Phospho- und Dephosphoenzym vor (38, 57).



Spencer, Hopkinson und Harris fanden 1964 bei der Auftrennung von Hämolysaten menschlicher Erythrozyten mittels Stärkegelelektrophorese individuell unterschiedliche Isoenzymmuster der PGM (57).

Heute kennt man drei Genloci PGM_1 , PGM_2 und PGM_3 (24, 26). Die Isoenzyme der drei Genloci unterscheiden sich voneinander durch ihr Molekulargewicht, ihre Temperaturempfindlichkeit, ihre Aktivitätsverteilung in den verschiedenen Geweben und ihre Reaktionsfähigkeit gegenüber thiolgruppenhaltigen Substanzen (17, 34, 35, 36). Die Isoenzyme eines Genortes stimmen in den genannten Eigenschaften jeweils überein. Man nimmt heute vielfach an, daß das Auftreten von Isoenzymen bei der PGM durch eine schrittweise verlaufende Oxidation der freien SH-Gruppen des Enzymmoleküls bedingt ist (17, 21, 28). Das jeweils kathodennächste Isoenzym wird als "primäres Isoenzym" bezeichnet und besitzt

sechs reduzierte SH-Gruppen (21); durch fortschreitende Oxidation dieser SH-Gruppen entstehen die sogenannten "sekundären Isoenzyme", die zunehmend mehr negative Ladungen tragen als das "primäre Isoenzym" und deshalb im elektrischen Feld schneller zur Anode hin laufen.

In Hämolysaten menschlicher Erythrozyten lassen sich nur die Produkte der beiden Genorte PGM_1 und PGM_2 nachweisen (34, 35). Die Isoenzyme der PGM_1 und der PGM_2 werden durch multiple Allele bestimmt: am Locus PGM_1 gibt es neben den beiden häufigsten Genen PGM_1^1 und PGM_1^2 weitere sechs Gene, die sehr selten auftreten (25, 49). Man kennt auch ein stummes Gen PGM_1^0 (14, 15). Bei der PGM_2 sind insgesamt fünf, bei der PGM_3 zwei verschiedene Allele bekannt (49).

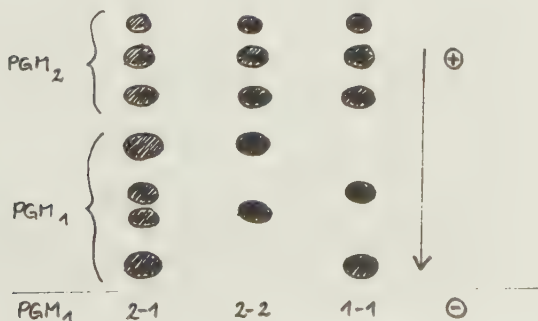
Die Isoenzyme der drei Genloci unterscheiden sich durch ihr Molekulargewicht: für die PGM_1 -Isoenzyme wird es mit 51 000 angegeben, für die PGM_2 -Isoenzyme mit 61 000 und für die PGM_3 -Isoenzyme mit 53 000 (36).

Die Isoenzyme des Locus PGM_2 sind am thermostabilsten, die Thermostabilität nimmt über die Isoenzyme des Locus PGM_1 zu denen des Locus PGM_3 hin weiter ab (34). Die Aktivitätsverteilung der PGM in den Geweben ist unterschiedlich: in den meisten Geweben entfallen 85 % bis 95 % der Aktivität auf die PGM_1 -Isoenzyme und zwischen 2 % und 15 % auf die PGM_2 . Die PGM_3 hat nur einen sehr geringen Anteil an der Gesamtaktivität. In den

Erythrozyten ist sie überhaupt nicht nachzuweisen; auf PGM_1 und PGM_2 entfallen im Blut je 50 % der Gesamtaktivität (28, 35).

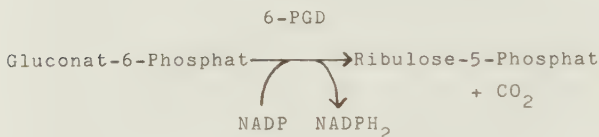
In dieser Arbeit wurden nur die PGM_1 -Isoenzyme berücksichtigt. Sie liegen am weitesten kathodisch und werden von der Kathode aus mit den Buchstaben a und d gekennzeichnet. Dabei sind die Isoenzyme a und c auf das Normgen PGM_1^1 , die Isoenzyme b und d auf das Normgen PGM_1^2 zurückzuführen. Dem Phänotyp PGM_1 2-1 liegen beide Normgene zugrunde; folglich findet man hier die vier Isoenzyme a, b, c und d mit jeweils halber Intensität wie bei den homozygoten Phänotypen (52). In Deutschland liegen die Genfrequenzen für PGM_1^1 zwischen 0,72 und 0,83 (29, 49), die Genfrequenzen betragen für PGM_1^2 zwischen 0,28 und 0,17. Die Genhäufigkeit der PGM_1^2 nimmt in Europa von Norden nach Süden zu (19).

Schematische Darstellung der wichtigsten PGM-Phänotypen:



4. 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase: 6-PGD
(E.C. 1.1.1.44)

Die 6-PGD ist ein wichtiges Enzym des Kohlenhydratstoffwechsels. Sie katalysiert den zweiten oxidativen Schritt des Pentosephosphatzyklus: die Umwandlung von Gluconat-6-Phosphat in Ribulose-5-Phosphat (18, 64) .



Fildes und Parr beschrieben 1963 erstmals den genetisch bedingten Enzympolymorphismus der 6-PGD (18) . Da man sich zunächst über die genetischen Mechanismen nicht im Klaren war, die den Aufbau des Enzyms bewirken, entstand eine uneinheitliche Nomenklatur. Man versah die verschiedenen Phänotypen mit Trivialnamen nach den Orten, an denen sie zuerst gefunden worden waren (9, 11, 18 , 40) .

Heute ist man der Ansicht, daß die Bildung der 6-PGD von einem einzigen autosomalen Genort kontrolliert wird. Man geht von einem 2-Allelen-System mit kodominanter Vererbung aus. Weiterhin sind heute zahlreiche, sehr selten vorkommende Varianten bekannt. Die Normgene PGD A und PGD B bestimmen die Phänotypen PGD A/PGD A und PGD B/PGD B (homozygot) sowie den heterozygoten Typ PGD A/PGD B (9, 11, 48, 52) .

Als unmittelbares Genprodukt entstehen sogenannte "subunits". Je zwei subunits lagern sich zu einem aktiven Enzymmolekül zusammen (9, 11, 28, 31). Der homozygote Typ PGD A/PGD A besteht aus gleichen subunits S^A und zeigt bei der Elektrophorese eine einzige Enzymbande. Ebenso verhält sich die sehr seltene homozygote Form 6-PGD B/PGD B. Bei der heterozygoten Form lagern sich die subunits S^A und S^B im Verhältnis 1:2:1 zusammen, so daß bei der elektrophoretischen Auftrennung drei Isoenzymbanden zu sehen sind, deren Intensitäten sich ebenfalls wie 1:2:1 verhalten (4). Diese Enzymmuster findet man z. B. in weißen Blutzellen; in Erythrozytenhämolysaten ist die Intensität der Enzymbanden anders verteilt; außerdem zeigen sich zusätzliche "Satellitenbanden" (4, 11). Die Ursache dieses Phänomens ist noch nicht bekannt.

Das Normgen 6-PGD A scheint eine höhere Thermostabilität und Substrataffinität seines Genproduktes zu bewirken als das Gen 6-PGD B. Thermostabilität und Substrataffinität sind beim Phänotyp 6-PGDA/PGD A am größten und nehmen über den Typ PGD A/PGD B zum Typ PGD B/PGD B hin ab (3, 8, 50). Das Molekulargewicht der verschiedenen Isoenzyme ist gleich: es wird für die subunits mit $40\ 000 \pm 4\ 000$ und für das aktive Enzym mit $79\ 000 \pm 8\ 000$ angegeben (31).

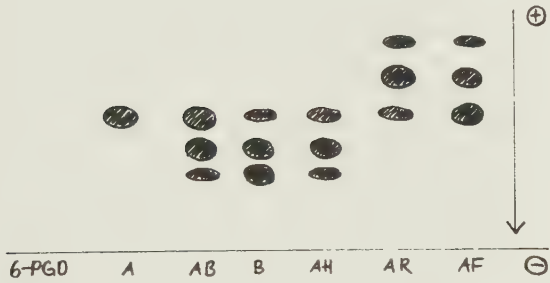
Außer den beiden Genen 6-PGD A und 6-PGD B sind heute noch etwa 15 weitere, sehr seltene Allele bekannt, die meist in heterozygoter

Form mit einem der Normgene auftreten
(3, 9, 11, 30, 40, 41, 62, 64). Ihre
Genprodukte unterscheiden sich von den übli-
chen Phänotypen hinsichtlich ihrer Isoenzym-
muster, der Enzymaktivität und -stabilität
und der Reaktion auf Behandlung mit verschie-
denen chemischen Substanzen, z. B. Mercapto-
äthanol und NADP.

Man nimmt auch die Existenz eines "stummen"
Gens PGD O an, welches die Bildung von subunits
kontrolliert, die nicht mit normalen subunits
zu aktiven Enzymmolekülen kombiniert werden
können (40, 41). So könnte man das Auftre-
ten von Individuen mit verminderter oder
fehlender 6-PGD-Aktivität erklären. Das hypo-
thetische Gen PGD W, das in homozygoter und
heterozygoter Form vorkommt, scheint die Bildung
von sehr labilen subunits zu verursachen (41).
Einige Varianten, so der Typ PGD AR (Richmond)
sind auf der ganzen Erde verbreitet. Das läßt
darauf schließen, daß es sich hierbei nicht um
zufällige Mutanten, sondern um Ergebnisse
natürlicher Selektion handelt (64). Der Typ
AF (Friendship) läßt sich nur in Abwesenheit
von NADP darstellen; unter dem Einfluß von
NADP erscheint er im Zymogramm als der Normtyp
6-PGD A/PGD A.

Die Genfrequenzen für die beiden Normgene
6-PGD A und 6-PGD B liegen in Deutschland bei
0,97 für 6-PGD A und 0,03 für 6-PGD B
(6, 39, 43).

Schematische Darstellung der wichtigsten
6-PGD-Phänotypen in Erythrozytenhämolysaten:



IV. Methodik der Isoenzymauftrennung

Die Isoenzyme der ADA, AK, PGM und 6-PGD in den Erythrozyten sind mittels CAF-Elektrophorese auftrennbar, da die Proteine des Hämolysats, bedingt durch ihre verschiedene Ladung, im elektrischen Feld unterschiedlich schnell in Richtung Anode oder Kathode laufen. Die Enzymbanden können durch eine für jedes der vier Enzyme spezifische Reaktionskette sichtbar gemacht werden. Der letzte Schritt ist bei den vier Reaktionsketten der gleiche: das Tetrazoliumsalz MTT (3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2) - 2,5 - diphenyltetrazoliumbromid) wird mit Hilfe von Phenazinmethosulfat (PMS) reduziert, so daß violette, unlösliches Formazan ausfällt und die für jedes Isoenzym charakteristischen Enzymbanden markiert.

1. Herstellung der Hämolysate

Bis zur Herstellung der Hämolysate wurde das mit ACD versetzte Venenblut bei $+4^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt.

Das Erythrozytensediment wird durch kurzes Zentrifugieren der Proben mit einer Tischzentrifuge "Eppendorf Zentrifuge 3 200" (16 000 U/Min.; 1 500 x g) und anschließendes Absaugen des Plasmas mittels einer Wasserstrahlpumpe gewonnen. Zum Waschen versetzt man die Erythrozyten mit 0,9 % Kochsalzlösung,

dann werden die Proben geschüttelt und etwa eine halbe Minute lang zentrifugiert. Der Überstand wird abgesaugt, und der Waschvorgang je nach Trübung des Überstandes noch ein bis zwei Mal wiederholt. Um eine vorzeitige Lyse der Erythrozyten zu vermeiden, muß man beim Durchmischen und Zentrifugieren der Proben vorsichtig vorgehen.

Die gewaschenen Erythrozyten werden bei -20°C eingefroren. Vor der endgültigen Bearbeitung sollte man die Proben noch ein bis zwei Mal kurz auftauen und erneut einfrieren, weil dadurch die Erythrozytenmembranen zerstört und die Enzyme freigesetzt werden. So kann man ein "Enzymschleppen" bei der Elektrophorese vermeiden. Einige der untersuchten Isoenzyme enthalten reaktionsbereite SH-Gruppen und ändern bei Lagerung ihr Verhalten im elektrischen Feld. Auch kann das wiederholte Einfrieren und Auftauen der Proben zu Aktivitätsverlusten bei den Enzymen führen. Deshalb sollte man die Hämolysate möglichst bald aufarbeiten.

2. Darstellung der Isoenzyimmuster mittels CAF-Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden zwei CAF-Kammern der Firma Biotest, Frankfurt, mit dem entsprechenden Auftragesystem verwendet. Als Elektrophoreseträger liefert dieselbe Firma Cellulose-Acetatfolien (CAF, 150 x 75 mm).

Pro Kammer können zwei Folien mit je acht Proben beimpft werden.

Für die elektrophoretische Auftrennung der vier Enzyme benötigt man zwei verschiedene Puffer und zur Entwicklung der Folien eine Stammlösung. Diese kann für die Darstellung aller vier Enzyme verwendet werden. Die Firma Biotest liefert die beiden Elektrophorese-puffer und die Stammlösung bereits fertig angesetzt, so daß man die Lösungen nur noch entsprechend verdünnen muß.

Je 250 ml der gebrauchsfertig verdünnten Pufferlösung werden in den anodischen und kathodischen Teil der Kammern gegossen, weitere 100 ml Puffer gibt man in ein flaches Gefäß und legt die benötigten Folien hinein, so daß sie etwa zehn Minuten lang von der Flüssigkeit durchtränkt werden. Danach werden sie zwischen Filterpapierstreifen vorsichtig abgetrocknet. Jetzt bringt man die Folien in die Kammern ein, so daß sie im anodischen und kathodischen Kammerteil je etwa 1 cm tief in den Puffer eintauchen. Die Folien sollen etwas gespannt sein, damit eine möglichst ebene Lauffläche entsteht. Den Kammerbrücken müssen sie glatt und blasenfrei aufliegen.

Bis zum Auftragen der Proben und während der Elektrophorese müssen die Kammern mit dem Deckel verschlossen werden, damit die Folien nicht austrocknen.

Die Auftrageschablone ermöglicht eine gleichmäßige Beimpfung der Folien: mit einer Eppendorf-Pipette werden die Hämolyse in kleinen Tropfen auf die acht markierten Stellen der Schablone gegeben und mit Hilfe des Auftragekammes auf die Folien übertragen; hierbei läßt sich die Hämolysemenge durch die angeschrägten Zacken des Kammes regulieren. Die Auftragestellen der Proben sind spezifisch für jedes Enzym.

Die Elektrophorese wird bei Zimmertemperatur durchgeführt. Sie dauert je nach Enzym zwischen 90 und 100 Minuten. Die benötigte konstante Gleichstromspannung von 300 Volt lieferte ein Netzanschlußgerät Typ 72498 der Firma DESAGA Heidelberg. Die Stromstärke steigt während der Elektrophorese pufferabhängig leicht an.

Zur Herstellung des Entwickleragars braucht man insgesamt 35 ml des verdünnten Stammlösungspuffers. Durch Erhitzen werden 300 mg Agar-Agar in 20 ml des Puffers gelöst, die fertige Agarlösung stellt man bis zum Gebrauch in ein Wasserbad von 50°C. Bei dieser Temperatur bleibt einerseits der Agar noch flüssig, andererseits werden die später dazugegebenen Entwicklerreagenzien nicht wärmebeschädigt. Die restlichen 15 ml Stammpuffer werden bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Kurz vor Beendigung der Elektrophorese löst

man darin die für die Entwicklung der Folien benötigten Chemikalien und gibt die Agarlösung dazu. Anschließend wird das Gemisch auf kleine Glasplatten ausgegossen, wo es innerhalb weniger Minuten erstarrt.

Man beendet nun die Elektrophorese. Die in den Puffer eintauchenden Enden der CA-Folien trennt man mit einem Messer ab, damit kein Elektrophoresepuffer auf die Laufflächen der Folien gerät und die Enzymmuster verwischt. Die Folien werden nun mit der Auftrageseite nach unten auf den Entwickleragar gelegt und in einer dunklen, feuchten Kammer bei 37°C je nach Enzym für eine bestimmte Zeit inkubiert. Dann hebt man die Folien vom Entwickleragar ab und reinigt sie durch Abspülen mit Wasser von Resten der Entwicklerreagenzien.

Nun erscheinen die charakteristischen Isoenzymmuster auf den transparenten Folien und können, am besten auf einer von unten beleuchteten Milchglasscheibe, betrachtet werden. Nach der Auswertung kann man die Folien unter Lichtabschluß trocknen und aufbewahren. Dabei verblassen die violetten Enzymmuster, werden aber nach erneutem Anfeuchten der Folien wieder sichtbar.

Bei der Darstellung der Isoenzymssysteme richteten wir uns im wesentlichen nach den Arbeitsanweisungen der Firma Biotest, die in der Broschüre von H.H. Sonneborn (52) zur Bestimmung der erythrozytären Enzympoly-

morphismen von ADA, AK, PGM und 6-PGD gegeben werden.

Im Unterschied zur Originalmethode wurden die Entwicklerreagenzien bei Zimmertemperatur in der Stammlösung aufgeweicht (19). Die zur Entwicklung benötigten Chemikalien wurden für jede Enzymdarstellung einzeln abgewogen.

Die zwei Pufferkonzentrate, die Stammlösung und die CA-Folien lieferte die Firma Biotest, Frankfurt. Agar-Agar, MTT und PMS stammten von der Firma Serva, Heidelberg, alle übrigen Reagenzien von der Firma Boehringer, Mannheim.

3. Einzelheiten zu den verschiedenen Isoenzym-Darstellungen

ADA: Die ADA ist das empfindlichste der vier untersuchten Enzyme und sollte zuerst bearbeitet werden. Die Hämolysate sollten vor der Elektrophorese insgesamt dreimal eingefroren und wieder aufgetaut werden, damit ein Enzymschleppen vermieden wird.

Elektrophoresepuffer: Phosphatpuffer 0,014 M
pH 6,25

15 g KH_2PO_4

5,2 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

0,1 g NaN_3

in 1000 ml Aqua dest.

Dieser Puffer wird zum Gebrauch

1 + 9 verdünnt.

Auftragestelle: etwa 1 cm von der kathod. Brücke
wandert Richtung Anode

Aufzutragende Hämolysatmenge: reichlich

Laufzeit: ca. 100 Minuten

Stromstärke: zu Beginn der Elektrophorese 8 mA
am Ende der Elektrophorese 15 mA

Stammpuffer: 18 g Tris

10 g $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$

1 g Na-Azid

mit n/10HCl auf pH 7,9 einstellen;

auf 1000ml auffüllen

Gebrauchsverdünnung 1 + 4

Entwicklerreagenzien: 25 mg Adenosin

5 mg Phenazinmethosulfat (PMS)

5 mg Tetrazoliumsalz (MTT)

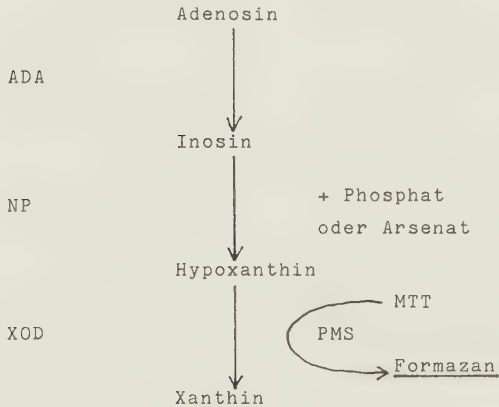
30 μl Xanthinoxidase (Suspension

20 mg / 2 ml)

30 μl Nucleosidphosphorylase
(Suspension 1 mg/ ml)

Inkubationszeit: 60 Minuten

Während der Entwicklung läuft folgende
Reaktionskette ab (nach Spencer et.al., 58):



Anmerkung:

Sonneborn beschrieb 1972 eine Methode, die
die gleichzeitige Darstellung von ADA und AK
auf einer Folie mittels CAF-Elektrophorese
ermöglicht (53) .

AK: Die AK ist gegenüber Lagerung und auch wiederholtem Einfrieren und Auftauen relativ unempfindlich. Sie wurde deshalb als letztes der vier Enzyme untersucht.

Elektrophoresepuffer: wie bei der ADA-Darstellung

Auftragestelle: etwa 1 cm von der anodischen Kammerbrücke, läuft Richtung Kathode

Aufzutragende Hämolyratmenge: gering

Laufzeit: 90 Minuten

Stromstärke: zu Beginn der Elektrophorese 8 mA
am Ende der Elektrophorese 15 mA

Stampfpuffer: wie bei der ADA-Darstellung

Entwicklerreagenzien: 150 mg Glucose

30 mg Adenosinphosphat (ADP)

10 mg Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat (NADP)

5 mg PMS

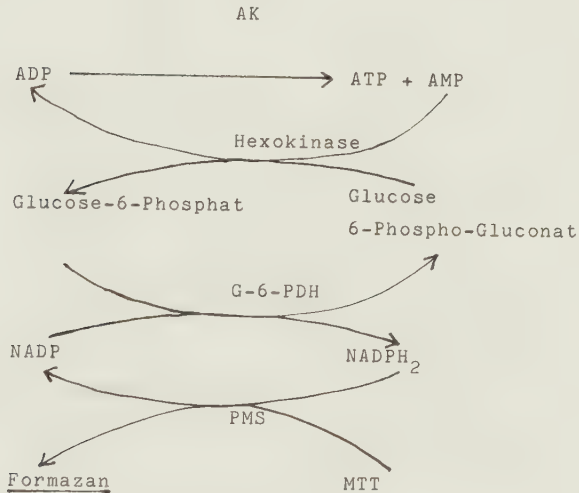
5 mg MTT

20 μ l Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
(G-6-PDH)

20 μ l Hexokinase

Inkubationsdauer: 10 bis 15 Minuten

Während der Entwicklung läuft folgende
Reaktionskette ab (nach Fildes und Harris,
16) :



PGM: Die PGM ist nach der ADA das empfindlichste der untersuchten Enzyme.

Elektrophoresepuffer:

Tris-Maleinsäurepuffer 0,00625 M, pH 7,4
61 g Tris
58 g Maleinsäure
19 g EDTA (Titriplex III)
10 g $MgCl_2$
mit NaOH auf Ph 7,4 einstellen und mit
Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen.
Dieser Puffer wird dann zum Gebrauch
1:74 verdünnt.

Auftragestelle: von der Mittellinie etwa
1 cm in Richtung Anode verschoben,
wandert kathodenwärts

Aufzutragende HämolySATmenge: reichlich

Laufzeit: 100 Minuten

Stromstärke: zu Beginn der Elektrophorese 7mA
am Ende der Elektrophorese 14 mA

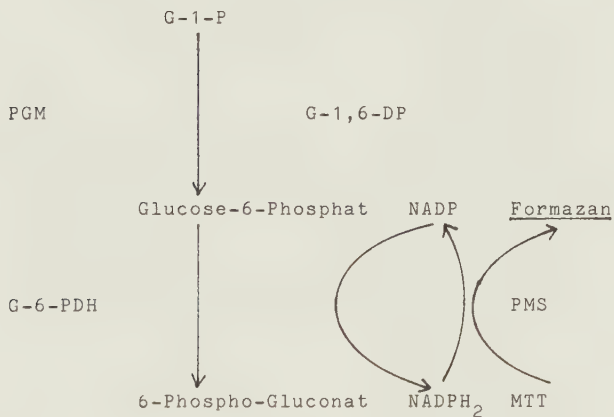
Stammpuffer: wie bei der ADA-Darstellung

Entwicklerreagenzien:

10 mg Nicotinamidadenindinucleotid-
phosphat (NADP)
70 mg Glucose-1-Phosphat (G-1-P)
0,5 mg Glucose - 1,6 - diphosphat
(G- 1,6 - DP)
5 mg PMS
7 mg MTT
20 μ l Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
(G-6-PDH)

Inkubationsdauer: 30 Minuten

Während der Entwicklung läuft folgende
Reaktionskette ab (nach Spencer et. al. ,
57) :



6-PGD:

Elektrophoresepuffer: wie bei der ADA-Darstellung

Auftragestelle: von der Mittellinie etwa 1 cm zur Anode hin verschoben, wandert kathodenwärts

Aufzutragende HämolySATmenge: gering

Laufzeit: 90 Minuten

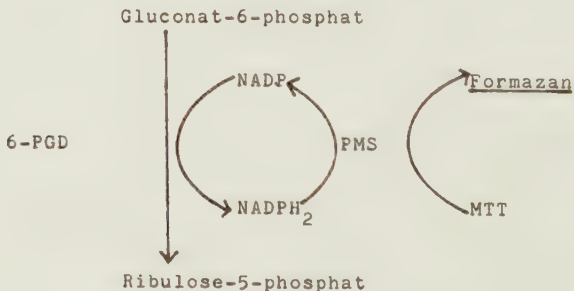
Stromstärke: zu Beginn der Elektrophorese 8 mA
am Ende der Elektrophorese 15 mA

Stammpuffer: wie bei der ADA-Darstellung

Entwicklerreagenzien: 15 mg Gluconat-6-phosphat
10 mg Nicotinamidadenindinucleotid-phosphat (NADP)
5 mg PMS
5 mg MTT

Inkubationsdauer: 5 Minuten

Während der Entwicklung läuft folgende Reaktionskette ab (Abb. nach Sonneborn, 52):



Anmerkung:

Sonneborn gab 1972 an (54) , daß der Typ 6-PGD A nach einer CAF-Elektrophorese von 80 Minuten Dauer zwei Isoenzymbanden etwa gleicher Intensität zeigt, während nach einer 105 Minuten dauernden Elektrophorese nur noch eine Enzymbande sichtbar wird.

V. Ergebnisse eigener Untersuchungen

1. Berechnung der Genfrequenzen

Aus den Ergebnissen der CAF-Elektrophorese wurden die Genfrequenzen in folgender Weise ermittelt:

Die absoluten Verteilungszahlen der verschiedenen Phänotypen eines Enzyms wurden ausgezählt. Wenn man die Anzahl der Homozygoten jeweils verdoppelt und zu jedem der beiden Werte die Anzahl der Heterozygoten addiert, erhält man die Genfrequenzen in absoluten Zahlen. Diese werden im Verhältnis zu eins in Dezimalbrüchen ausgedrückt, indem man sie durch die Gesamtanzahl der Gene dividiert. Aus den beobachteten Genfrequenzen errechnet man sich die Erwartungswerte, d. h. diejenige Phänotypenverteilung, die sich ergeben würde, wenn sich die Gene völlig dem Zufall nach verteilt hätten. Die Erwartungswerte errechnen sich nach der Formel für das sogenannte

"Hardy-Weinberg-Gleichgewicht" :

$$(a+b)^2 = a^2 + 2 ab + b^2 .$$

Man erhält die Werte der Homozygoten, indem man die jeweiligen Genfrequenzen quadriert, und den Erwartungswert des heterozygoten Phänotyps, indem man die beiden Genfrequenzen miteinander und anschließend mit zwei multipliziert. Die errechneten Dezimalbrüche werden mit der Gesamtzahl der Phänotypen multipliziert, und es ergeben sich die Erwartungswerte in absoluten Zahlen.

Anschließend wurde die beobachtete und die erwartete Phänotypenverteilung mittels des χ^2 -Tests verglichen. Man kann dadurch nachprüfen, ob sich die Gene tatsächlich wie erwartet nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz, nämlich etwa zufällig verteilt haben, oder ob die gefundenen von den erwarteten Werten aufgrund eines Auslesefaktors oder eines systematischen Meßfehlers wesentlich abweichen.

Als Nullhypothese formuliert man die Annahme, daß die gefundene Phänotypenverteilung von der erwarteten nicht abweicht; als Alternativhypothese nimmt man an, daß eine überzufällige Abweichung der beobachteten von den erwarteten Werten vorliegt, d. h., daß die Gene sich entweder nicht nach ihrer Wahrscheinlichkeit verteilt haben oder ein systematischer Auswertungsfehler vorliegt. Bei einem vorgegebenen Signifikanzniveau von $\alpha = 0,05$ kann man die Alternativhypothese dann mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % annehmen, wenn der errechnete χ^2 -Wert über dem Zahlenwert für die 5%-Grenze liegt. Dieser beträgt bei zwei Freiheitsgraden 5,991.

Das folgende Beispiel zeigt die beschriebenen

Der gefundene χ^2 -Wert von 45,8 zeigt, daß die gefundenen Phänotypen der PGM bei den ungarischen Probanden sich nicht nach der Hardy-Weinberg-Regel verteilen.

Um die gefundenen Daten, die ja größtenteils von Patienten stammen, die an malignen Neubildungen erkrankt waren (und die im folgenden kurz "Kranke" genannt werden), mit denen von solchen Patienten vergleichen zu können, die keine derartige Krankheit hatten, wurden geeignete Bezugsdaten benötigt. Diese wurden aus der Arbeit von H.Gailer (19) übernommen. Als "gesunde" Vergleichspersonen aus Ungarn werden hier 410 Spender aus dem westungarischen Raum herangezogen, von denen 215 gesunde Blutspender waren ; 106 litten an Lebererkrankungen und 89 an Augenerkrankungen, davon 83 an angeborenem Katarakt. Die 410 "gesunden" Vergleichspersonen aus Franken waren Kinder aus dem Einzugsgebiet der Universitäts-Kinderklinik Erlangen, bei denen aus diagnostischen Gründen eine Blutentnahme nötig war. Es kann also sowohl bei dem ungarischen als auch bei dem fränkischen Vergleichskollektiv nicht ausgeschlossen werden, daß einzelne Patienten mit malignen Neubildungen miterfaßt wurden.

Zum Vergleich der Phänotypenverteilungen der einzelnen Enzyme, die bei den Patienten mit bösartigen Neubildungen gefunden wurden, mit den Phänotypenverteilungen der "gesunden" Kontrollpersonen wurde der χ^2 -Häufigkeitstest

herangezogen. Mit diesem Test kann man nachprüfen, ob die verglichenen Stichproben aus der gleichen Grundgesamtheit stammen.

Als Nullhypothese formuliert man die Annahme, daß die Phänotypenverteilungen der "kranken" Personen von denen der "gesunden" Vergleichspersonen nicht abweichen. Die Alternativhypothese dagegen nimmt an, daß "kranke" und "gesunde" Probanden unterschiedliche Genhäufigkeiten und damit unterschiedliche Phänotypenverteilungen aufweisen. Die Prüfgröße χ^2 ermittelt man in diesem Fall mit einer Vierfeldertafel:

Die absoluten Anzahlen der in einem Gebiet gefundenen Phänotypen eines Enzyms bei "Gesunden" und "Kranken" wurden in eine 2x2-Felder-Tafel eingetragen (bei den Enzymen mit drei verschiedenen Normphänotypen benötigte man dementsprechend eine 2x3-Felder-Tafel). Die Berechnung der Prüfgröße χ^2 geschah nach folgendem Schema:

			Zeilensumme
1. Stichprobe	a	c	n
2. Stichprobe	b	d	m
Spaltensumme	r	s	N

Dabei ist
 $c = n - a$
 $d = m - b$
 $r = a + b$
 $s = c + d$
 $N = n + m$

$$\chi^2 = \frac{(ad + bc)^2 N}{nmrs}$$

Der Freiheitsgrad läßt sich nach der Formel
 (Anzahl der Zeilen minus 1) x (Anzahl
 der Spalten minus 1) berechnen. Demnach
 beträgt er für eine 2x2-Felder-Tafel 1 und
 für eine 2x3-Felder-Tafel 2. Die Verwerfung
 der Nullhypothese bei einem Signifikanz-
 niveau $\alpha = 0,05$ erfolgt, wenn der X^2 - Wert
 größer ist als 3,841 (bei 1 Freiheitsgrad)
 bzw. größer als 5,991 (bei 2 Freiheitsgraden).
 Die so errechneten X^2 - Werte wurden mit dem
 Index GK versehen (GK steht für "gesund/
 krank").

Hier soll als Beispiel die Durchführung des
 3x2-Feldertests zum Vergleich der Phänotypen-
 verteilung der ADA bei "kranken" und "gesunden"
 Probanden aus Westungarn gezeigt werden:

ADA Westungarn

Freiheitsgrad:
 (3-1) x (2-1) = 2

	"krank"	"gesund"	Zeilensumme
ADA 1-1	175	327	502
ADA 2-1	31	71	102
ADA 2-2	2	12	14
Spaltensumme	208	410	618

$$X_{GK}^2 = 3,165$$

Der errechnete X^2 - Wert liegt unter dem für
 ein Signifikanzniveau $\alpha = 0,05$ angegebenen

Zahlenwert von 5,991 bei zwei Freiheitsgraden. Demnach kann man die Nullhypothese mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5% nicht verwerfen, d. h. ein Unterschied in der Phänotypenverteilung der ADA zwischen "gesunden" und "kranken" Probanden aus Ungarn ist nicht nachzuweisen.

2. Genfrequenztabellen

	<u>Phänotyp</u>	<u>b</u>	<u>e</u>	<u>χ^2</u>	<u>Genfrequenzen</u>
ADA					
Franken	1-1	153	152,3	0,0032	ADA 1: 0,9523
	1-2	14	15,3	0,1105	ADA 2: 0,0477
	2-2	1	0,4	0,9000	
		168	168,0	1,0137	
ADA					
Ungarn	1-1	175	174,5	0,0014	ADA 1: 0,9159
	1-2	31	32,1	0,0376	ADA 2: 0,0841
	2-2	2	1,5	0,1666	
		208	208,1	0,2056	
AK					
Franken	1-1	145	145,2	0,0003	AK 1: 0,9708
	1-2	9	8,1	0,1000	AK 2: 0,0292
	2-2	0	0,1	0,1000	
		154	153,4	0,2003	
AK					
Ungarn	1-1	186	186,2	0,0002	AK 1: 0,9650
	1-2	14	13,5	0,0185	AK 2: 0,0350
	2-2	0	0,2	0,2000	
		200	200,0	0,2187	

b = beobachteter Wert

e = erwarteter Wert

	<u>Phänotyp</u>	<u>b</u>	<u>e</u>	<u>χ^2</u>	<u>Genfrequenzen</u>
PGM	1-1	144	141,6	0,0407	PGM 1:0,9407
Franken	1-2	13	17,9	1,3413	PGM 2:0,0593
	2-2	3	0,6	9,6000	
		160	160,1	10,9820	
PGM	1-1	171	159,7	0,7995	PGM 1:0,8679
Ungarn	1-2	26	48,6	10,5094	PGM 2:0,1321
	2-2	15	3,7	34,5108	
		212	212,0	45,8198	
6-PGD	AA	169	169	0	6-PGD A:1,0000
Franken	AB	0	0	0	6-PGD B:0,0000
	BB	0	0	0	
		169	169	0	
6-PGD	AA	203	203,1	0,0000	6-PGD A:0,9857
Ungarn	AB	6	5,9	0,0000	6-PGD B:0,0143
	BB	0	0,0	0,0400	
		209	209,0	0,0401	

b = beobachteter Wert

e = erwarteter Wert

Vergleich zwischen "gesunden" und "kranken"
Probanden

ADA Franken

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	346	153	499
2-1	56	14	70
2-2	8	1	9
Spaltensumme	410	168	578

$$\text{FG 2} \quad \chi^2_{\text{GK}} = 4,814$$

ADA Ungarn

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	327	175	502
2-1	71	31	102
2-2	12	2	14
Spaltensumme	410	208	618

$$\text{FG 2} \quad \chi^2_{\text{GK}} = 3,165$$

AK Franken

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	379	145	524
2-1	31	9	40
Spaltensumme	410	154	564

FG 1 $\chi^2_{\text{GK}} = 0,5008$

AK Ungarn

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	375	186	561
2-1	35	14	49
Spaltensumme	410	200	610

FG 1 $\chi^2_{\text{GK}} = 0,4269$

PGM Franken

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	260	144	404
2-1	124	13	137
2-2	26	3	29
Spaltensumme	410	160	570

FG 2 $\chi^2_{GK} = 39,416$

PGM Ungarn

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
1-1	266	171	437
2-1	116	26	142
2-2	28	15	43
Spaltensumme	410	212	622

FG 2 $\chi^2_{GK} = 20,693$

6-PGD Franken

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
AA	395	169	564
AB	15	0	15
Spaltensumme	410	169	579

FG 1 $\chi^2_{GK} = 6,347$

6-PGD Ungarn

Phänotyp	"Gesunde"	"Kranke"	Zeilensumme
AA	397	203	600
AB	12	6	18
Spaltensumme	409	209	618

FG 1 $\chi^2_{GK} = 0,002$

3. Vergleich der Genfrequenzen mit
Genfrequenzen bei "gesunder" Probanden

ADA Franken

$$\text{ADA 1:0,9523} \quad X^2 = 1,0137 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

$$\text{ADA 2:0,0477} \quad X_{\text{GK}}^2 = 4,814 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

ADA Ungarn

$$\text{ADA 1:0,9159} \quad X^2 = 0,2057 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

$$\text{ADA 2:0,0841} \quad X_{\text{GK}}^2 = 3,165 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

Die X^2 -Werte liegen für Franken und Westungarn unter der 5%-Grenze, d. h., die Phänotypenverteilung richtet sich nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz. Es lassen sich für beide Gebiete keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genhäufigkeiten "gesunder" und "kranker" Probanden feststellen.

AK Franken

$$\text{AK 1:0,9708} \quad X^2 = 0,2003 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

$$\text{AK 2:0,0292} \quad X_{\text{GK}}^2 = 0,5008 \quad 5\text{-Grenze (FG 1)} = 3,84$$

AK Ungarn:

$$\text{AK 1:0,965} \quad X^2 = 0,2187 \quad 5\text{-Grenze (FG 2)} = 5,99$$

$$\text{AK 2:0,035} \quad X_{\text{GK}}^2 = 0,4296 \quad 5\text{-Grenze (FG 1)} = 3,84$$

Die Unterschiede zwischen beobachteten und

erwarteten Genfrequenzen in Franken und Westungarn sind nicht signifikant, d. h. eine Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilung ist nicht nachzuweisen. Auch lassen sich für beide Gebiete keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genhäufigkeiten bei "Gesunden" und "Kranken" nachweisen.

PGM Franken

PGM 1:0,9407 X^2 = 10,98 5%-Grenze (FG 2) = 5,99
PGM 2:0,0593 X_{GK}^2 = 39,416 5%-Grenze (FG 2) = 5,99

PGM Ungarn

PGM 1:0,8679 X^2 = 45,819 5%-Grenze (FG 2) = 5,99
PGM 2:0,1321 X_{GK}^2 = 20,693 5%-Grenze (FG 2) = 5,99

Die beobachteten Phänotypenverteilungen der PGM weichen bei Ungarn und Franken stark von den nach der Hardy-Weinberg-Verteilungsregel zu erwartenden Werten ab. Die X^2 -Werte, die zum Vergleich der Genfrequenzen von "Gesunden" und "Kranken" ermittelt wurden, liegen für beide Gebiete deutlich über der 5%-Grenze. Auch bei Vorgabe einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 0,1 % (0,1 % -Grenze bei FG 2 = 13,82) sprächen die errechneten X^2 -Werte noch für einen signifikanten Unterschied.

6-PGD Franken

6-PGD A: 1.000

6-PGD B: 0,000 $\chi^2_{GK} = 6,347$ 5%-Grenze (FG 1) = 3,84

6-PGD Ungarn

6-PGD A: 0,9857 $\chi^2 = 0,041$ 5%-Grenze (FG 2) = 5,99

6-PGD B: 0,0144 $\chi^2_{GK} = 0,002$ 5%-Grenze (FG 1) = 3,84

Im Untersuchungsmaterial der Probanden aus Franken wurde nur der Phänotyp 6-PGD AA gefunden. Für die Phänotypenverteilung der 6-PGD in Ungarn läßt sich eine deutliche Abweichung von der Hardy-Weinberg-Verteilungsregel nicht nachweisen. Der zum Vergleich der Phänotypenverteilung der 6-PGD bei "Gesunden" und "Kranken" ermittelte χ^2 -Wert liegt für Franken über der 5%-Grenze. Für Westungarn läßt sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

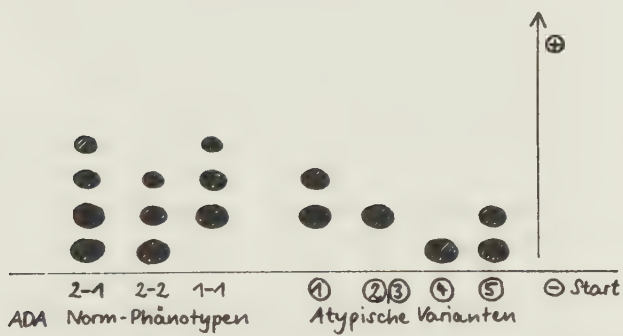
4. Irreguläre Isoenzymmuster

Die aufgetretenen Fälle von außergewöhnlichen Isoenzymmustern wurden auf den Abbildungen von 1 bis 14 durchnummeriert.

ADA

Bei der Untersuchung der ADA-Isoenzyme fanden sich bei fünf Proben außergewöhnliche Isoenzymmuster, die nicht den Norm-Phänotypen zugeordnet werden konnten. In allen diesen Fällen waren jeweils nur eine oder zwei kathodennahe Banden zu sehen. Diese Fälle wurden bei der Genfrequenzberechnung nicht berücksichtigt. Vier der Proben stammten von Patienten aus Westungarn, die wegen Lymphogranulomatose zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter cytostatischer Behandlung standen. Eine Probe stammte von einem Kind, bei dem ein Rückenmarkstumor bekannt war. Dieses Kind wurde nicht cytostatisch behandelt. In zwei Fällen konnte das Ergebnis durch eine Wiederholung der Elektrophorese bestätigt werden, drei der Proben wurden nicht nachuntersucht.

Schematische Darstellung der ADA-Varianten:

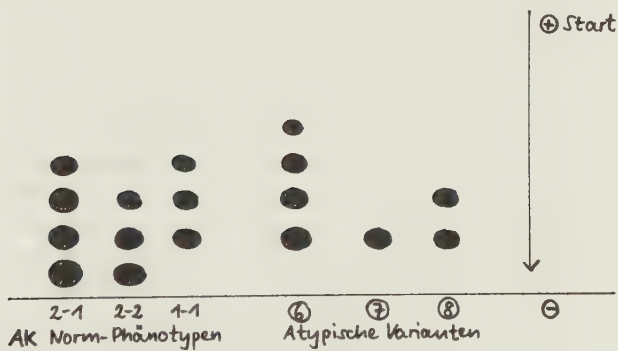


AK

Bei der Darstellung der Adenylatkinase ergaben sich bei drei Proben ungewöhnliche Isoenzymmuster, die nicht denen der bekannten Phänotypen entsprachen. In einem der Fälle entstand eine vierte, weiter anodwärts gelegene Enzymbande beim Typ AK 1-1. Sechs Monate später zeigte eine weitere Blutprobe derselben Patientin (die im 6-PGD-System eine atypische Richmond-Variante aufwies), den Phänotyp AK 1-1. Die Patientin stand wegen Lymphogranulomatose unter Behandlung mit Cytostatika.

In den beiden anderen Fällen fanden sich nur eine bzw. zwei Isoenzymbanden, die den am weitesten kathodisch gelegenen Banden des Typs AK 1-1 entsprachen. Die beiden Probanden waren Kinder, die wegen akuter Lymphoblastenleukämie (ALL) an der Universitätskinderklinik Erlangen behandelt wurden. Eins der Kinder bekam zum Zeitpunkt der Blutentnahme Cytostatika. In einem Fall bestätigte eine zweite Untersuchung derselben Probe das Ergebnis, die andere Probe konnte nicht nachuntersucht werden.

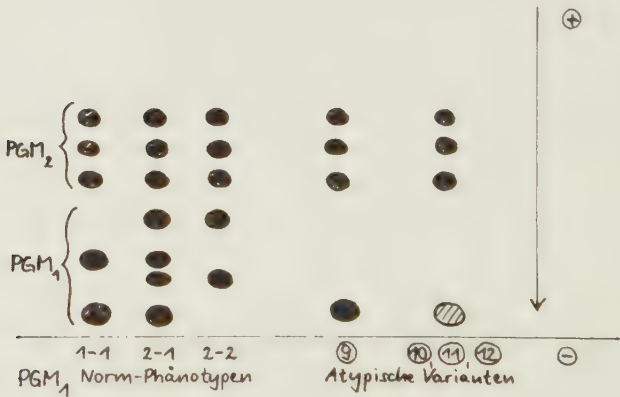
Schematische Darstellung der AK-Varianten:



PGM

Bei der PGM wurden in vier Fällen atypische Isoenzymmuster gefunden: bei allen vier Probanden stellte sich nur die kathoden-nächste Bande dar, die bei den Phänotypen PGM 1-1 und PGM 2-1 auftritt und als "a"-Bande bezeichnet wird. In drei Fällen war sie nur sehr schwach ausgeprägt. Die vier Proben wurden nicht in die Genfrequenzberechnung einbezogen. Sie stammten von Kindern aus dem Einzugsgebiet der Kinderklinik Erlangen. Alle vier Kinder litten an akuter lymphoblastischer Leukämie, drei von ihnen standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter Behandlung mit cytotoxischen Medikamenten. Die zuerst gewonnenen Ergebnisse wurden durch eine zweite Untersuchung derselben Proben bestätigt.

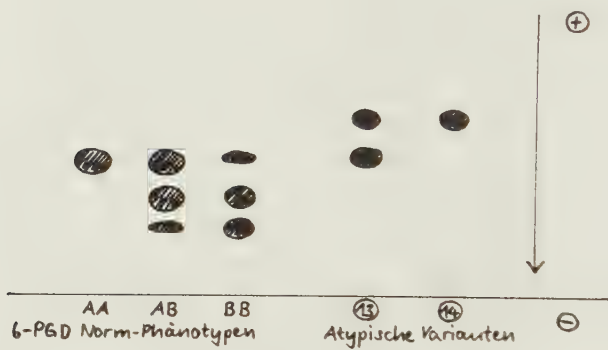
Schematische Darstellung der PGM-Varianten:



6-PGD

Bei der Untersuchung der 6-PGD-Isoenzyme bot eine Probe ein ungewöhnliches Bandenmuster. Dieser Phänotyp war schon bei früheren Untersuchungen von Blutproben derselben Probanden aufgefallen (2,19). Die Frau stammte aus Westungarn und stand wegen Lymphogranulomatose unter cytostatischer Behandlung. Die Elektrophorese ergab folgendes Isoenzymmuster: Außer der beim Typ PGD AA auftretenden kathodennahen Enzymbande wurde eine zweite, etwa gleichstarke, weiter anodenwärts gelegene Bande sichtbar. Dieses Ergebnis konnte an einer weiteren Probe ein Vierteljahr später erneut gefunden werden. Nach weiteren sechs Monaten wurde das Blut der Patientin, die mittlerweile verstorben ist, von uns zum letzten Mal untersucht. Es trat diesmal nur eine einzige Enzymbande auf, die der in den ersten Proben gefundenen, weiter anodisch gelegenen Bande entsprach. Die Ergebnisse der Untersuchung der 6-PGD dieser Probandin wurden bei der Berechnung und dem Vergleich der Genfrequenzen nicht berücksichtigt.

Schematische Darstellung der 6-PGD-Varianten:



VI. Diskussion

1. Interpretation der gefundenen Genfrequenzen

ADA

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß die Häufigkeit des Gens ADA 2 in Europa von ca. 6 % im Norden auf etwa 9 % im Süden ansteigt.

Die in dieser Arbeit gefundene Genfrequenz der ADA 2 betrug für Franken 4,8 %. Der Wert liegt etwas niedriger als die bisher für Süddeutschland bekannten Genfrequenzen von 5 % bis 9 % (46, 47 , 55, 61). Die ADA enthält reaktionsbereite SH-Gruppen, die mit dem oxidierten Glutathion reagieren können, welches sich beim Aufbewahren in den Hämolysaten anreichert. Dadurch werden die elektrische Ladung und die Motilität der Isoenzyme beeinflusst. Die weiter anodisch gelegenen Banden erscheinen in älteren Proben stärker ausgeprägt, die langsamen, kathodisch gelegenen Isoenzyme zeigen nur noch geringe Aktivität. Dadurch kann es geschehen, daß die Phänotypen ADA 2-1 und ADA 2-2 als der Typ ADA 1-1 verkannt werden. Die Blutproben der Probanden aus Franken wurden oft während eines Zeitraums von etwa zwei Wochen in der Poliklinik gesammelt, so daß Proben von unterschiedlichen Entnahmezeitpunkten zusammen verarbeitet werden mußten. Möglicherweise wurden einige Proben vom Typ ADA 2-1 oder

ADA 2-2 aufgrund der beschriebenen Alterungsvorgänge fälschlicherweise als Typ ADA 1-1 berücksichtigt, wodurch sich die leicht erhöhte Genfrequenz der ADA 1-1 erklären ließe.

Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genfrequenzen der ADA bei "gesunden" Vergleichspersonen und solchen, die an malignen Neubildungen erkrankt waren, ließ sich im Untersuchungsgut der fränkischen Probanden nicht feststellen.

Für das Gen ADA 2 bei den westungarischen Probanden wurde eine Frequenz von 0,084 ermittelt. Dieser Wert liegt etwas niedriger als die aus diesem Raum bekannte Vergleichszahl von 0,116 (19). Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genhäufigkeiten der ADA bei "Gesunden" und "Kranken" konnte auch hier nicht gefunden werden.

AK

In Mitteleuropa schwankt die Frequenz des Gens AK 2 zwischen 0,031 und 0,050 (1,52), innerhalb Europas läßt sich jedoch eine Zunahme der Genfrequenzen der AK nach Osten hin erkennen (63) .

Die für Franken ermittelte Häufigkeit des Gens AK 2 liegt mit einem Wert von 0,029 etwas niedriger als früher gefundene Werte

(19: AK 2 in Franken 0,039). Der Phänotyp AK 2-1 kam im Untersuchungsgut der Probanden aus Franken neunmal, der Typ AK 2-2 kein einziges Mal vor. Der Unterschied ist jedoch geringfügig und wahrscheinlich rein zufälliger Art: wenn der Phänotyp AK 2-1 statt 9 mal zum Beispiel 12 mal aufgetreten wäre, hätte das eine Zunahme der Genfrequenz der AK 2 um 0,02 auf 0,031 zur Folge gehabt.

Der Unterschied zwischen den Genfrequenzen der AK bei "Gesunden" und "Kranken" in Franken ist nicht signifikant.

Für das Gen AK 2 im Untersuchungsgut der Probanden aus Westungarn beträgt die Frequenz 0,035. Dieser Wert weicht nicht wesentlich von den bisher gefundenen ab (19, 33). Auch für Westungarn läßt sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Genfrequenzen "gesunder" und "kranker" Vergleichspersonen bei der AK nicht nachweisen.

PGM

Die Phosphoglucomutase zeigt in Europa in Nord-Süd-Richtung eine deutliche Zunahme des Gens PGM_1^2 von 0,2 auf 0,3 (19) .

Die vorliegende Untersuchung ergab sowohl für Franken als auch für Westungarn wesentlich geringere PGM_1^2 -Genfrequenzen: die Frequenz für das Gen PGM_1^2 lag im Untersuchungs-

gut der Probanden aus Franken bei 0,059 und im Untersuchungsgut der Probanden aus Westungarn bei 0,132. Beim Vergleich der Genfrequenzen "gesunder" mit denen "kranker" Probanden im 2x3-Felder-Test betrug der χ^2 -Wert für Franken 39,4, der für Westungarn 20,7 beim Freiheitsgrad 2. Auch die Überprüfung der Proben auf ihre Konsistenz nach dem Hardy-Weinberg-Gesetz ergab für beide Gebiete signifikante Abweichungen von der Hardy-Weinberg-Verteilungsregel ($\chi^2_{\text{Franken}} = 10,98$; $\chi^2_{\text{Ungarn}} = 45,82$; FG 2) .

Die Zuordnung der einzelnen Proben zu den verschiedenen PGM-Phänotypen bereitete in der vorliegenden Untersuchung stets größte Schwierigkeiten, obwohl das Material so bald wie möglich bearbeitet wurde und die Arbeitsvorschriften genau eingehalten wurden. Die meisten Läufe mußten einmal, manche auch mehrere Male wiederholt werden; trotzdem war in vielen Fällen eine eindeutige Bestimmung des Phänotyps der einzelnen Proben nicht möglich. Die Isoenzyme der PGM₁ zeigten nur sehr geringe Aktivität, die Banden waren verwaschen.

Es ist wahrscheinlich, daß die oben beschriebene Abweichung der Genfrequenzen und die schlechte Übereinstimmung mit der Hardy-Weinberg-Regel durch die Fehlinterpretation einer größeren Anzahl von Proben zustandekamen.

In der Literatur fand sich kein Hinweis auf außergewöhnliche Schwierigkeiten bei der Darstellung der PGM₁- Isoenzyme. Es wird vielmehr beschrieben, daß die PGM₁- Isoenzyme auch nach längeren Lagerzeiten noch eine verlässliche Typendifferenzierung erlauben (17, 21, 37, 49). Man muß die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß die Aktivität der PGM₁- Isoenzyme durch die Grunderkrankung der Patienten oder durch die Behandlung mit cytotoxischen Arzneimitteln herabgesetzt war.

6-PGD

Bei der 6-PGD läßt sich in Europa eine Häufigkeitszunahme des Gens 6-PGD B von 0,01 im Norden auf 0,04 in den Mittelmeerlandern feststellen (64) .

In dem hier untersuchten Krankengut aus Franken wurde nur der Phänotyp 6-PGD A gefunden; das ergibt eine Genfrequenz von 1,0 für 6-PGD A. Beim Vergleich der Gen-Frequenzen "gesunder" mit denen "kranker" Probanden kam ein χ^2 -Wert zustande, der für einen signifikanten Unterschied zwischen den Genfrequenzen der 6-PGD beider Vergleichsgruppen spricht. Falls die Überrepräsentation der 6-PGD A in Franken nicht einfach durch einen Zufall begründet sein sollte, läßt sie sich nicht ohne weiteres erklären; zumal die Untersuchung der 6-PGD-Isoenzyme stets sehr deutlich sichtbare Bandenmuster ergab, so daß eine Fehlinterpretation bei mehreren Proben unwahrscheinlich ist.

Die Genfrequenz der 6-PGD B im Krankengut der Probanden aus Westungarn lag bei 0,014; dieser Wert paßt sehr gut zu den bisher gefundenen aus diesem Raum (2 , 19).
Ein signifikanter Unterschied zwischen den Genfrequenzen "Gesunder" und "Kranker" läßt sich hier nicht nachweisen.

2. Diskussion der atypischen Varianten

ADA

Von Spencer et. al. wurde 1968 die Häufigkeit seltener Varianten bei der ADA mit 0,42 % angegeben. Das bedeutet, daß bei 42 von 100 000 untersuchten Proben die seltenen ADA Gene, jeweils zusammen mit einem der Normgene als heterozygote Phänotypen, zu beobachten wären (22) .

Bei der vorliegenden Untersuchung zeigten fünf von 381 Proben ungewöhnliche ADA-Isoenzymmuster; das sind 1,3 %. Zudem stimmen die beobachteten Bandenmuster nicht mit denen der in der Literatur beschriebenen seltenen Phänotypen überein: in drei Fällen traten zwei, in zwei Fällen nur eine kathodenah gelegene Enzymbande auf (siehe Teil "Eigene Ergebnisse" , Seite 49).

In der Literatur wurde bereits mehrfach mitgeteilt, daß bei Patienten mit "kombinierter Immunodefizienz" die ADA-Aktivität herabgesetzt war bzw. völlig fehlte. Als Ursache hierfür wurde ein "stummes" Gen ADA 0 erkannt (10, 44, 59). Auch das Gen ADA 3 scheint eine deutlich verminderte ADA-Aktivität zu bewirken (13, 23). Es besteht die Möglichkeit, daß die hier gefundenen außergewöhnlichen Isoenzymmuster der ADA auf ein in heterozygoter Form vorliegendes Gen ADA 0 zurückzuführen sind, und daß auf-

grund einer geringeren ADA-Aktivität nur die ohnehin stärkeren kathodennahen Enzymbanden sichtbar wurden. Die gefundenen Varianten Nr. 1, 2 und 3 wären dann als Typ ADA 1-0, Nr. 4 und 5 als Typ ADA 2-0 einzuordnen. Nr. 1 könnte auch ein Typ ADA 3-1 sein, bei dem die kathodennahe und die anodennahe Bande jeweils sehr schwach ausgeprägt sind und hier vielleicht nicht erkannt wurden (13, 23).

Man muß die Möglichkeit in Betracht ziehen, daß eine Verminderung der ADA-Aktivität, wie sie in den fünf beschriebenen Fällen vorzuliegen scheint - und die in der Literatur mehrfach mit einer Schwäche der Immunabwehr in Verbindung gebracht wird - für die Entstehung der malignen Neubildungen mitverantwortlich sein könnte, an der die untersuchten Probanden erkrankt waren.

Vier der fünf Patienten, bei denen die atypischen ADA-Varianten gefunden wurden, standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme wegen Lymphogranulomatose unter Behandlung mit cytotoxischen Arzneimitteln. Durch weiterführende Untersuchungen könnte geklärt werden, wie sich die Aktivität und Aktivitätsverteilung auf die einzelnen Isoenzyme der ADA unter cytostatischer Behandlung verhalten, da man auch an die Möglichkeit denken muß, daß die Aktivität und die Stabilität der Erythrozytenenzyme durch die cytostatische Behandlung beeinflusst werden.

AK

Fildes und Harris gaben 1966 die Häufigkeit der seltenen Allele bei der AK mit 0,15 auf 1000 Beobachtungen an, d. h. von 100 000 Probanden trügen 15 eines der seltenen Gene in heterozygoter Form mit einem der Normgene (22) .

In dem hier untersuchten Krankengut wurden bei 3 von 357 Probanden außergewöhnliche Isoenzymmuster der AK gefunden; das entspricht einer Häufigkeit von 0,84 %.

In einem der Fälle (Nr. 6) trat zusätzlich zu den "normalen" Isoenzymbanden eines Typs AK 1-1 eine weitere Bande auf, die weiter anodenwärts lag als das langsamste AK-Isoenzym. Sechs Monate später fand sich bei der Untersuchung der AK bei derselben Patientin der normale Phänotyp AK 1-1. Fildes und Harris beschrieben 1966 beim Typ AK 1-1 insgesamt vier Isoenzymbanden, von denen die am weitesten anodisch gelegenen schwierig zu unterscheiden seien (16). Diese Angabe erklärt aber nicht ohne weiteres den beschriebenen Befund, da bei den gleichzeitig bearbeiteten Proben vom Typ AK 1-1 nur drei Isoenzymbanden zu unterscheiden waren.

In einem weiteren Fall (Nr. 7) war nur eine einzige Isoenzymbande zu erkennen, die dem schnellsten Isoenzym des Typs AK 1-1 entsprach. Das Kind litt an akuter lymphoblastischer Leukämie, stand aber zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht unter cytostatischer Behandlung.

Im dritten Fall (Nr. 8) zeigten sich zwei Enzymbanden, die in ihrer Lage den beiden schnelleren Banden eines Typs AK 1-1 bzw. den beiden langsameren Isoenzymen eines Typs AK 2-2 vergleichbar waren. Die Blutprobe stammte von einem Kind, das ebenfalls wegen ALL mit cytotoxischen Medikamenten behandelt wurde.

Auch bei der AK wurden mehrfach Fälle von verminderter Aktivität in den Erythrozyten beschrieben, deren Ursache man wohl in einem "stummen" Gen AK 0 zu suchen hat, das autosomal vererbt wird und sich bei heterozygoten Genträgern unterschiedlich stark auswirkt (51 , 60). Bisher wurde das Auftreten dieses "stummen" Allels AK 0 aber nur mit Schwachsinn in Verbindung gebracht (51). Die Fälle Nr. 7 und Nr. 8 ließen sich vielleicht als Typ AK 1-0 erklären, wobei bei herabgesetzter AK-Aktivität nur die ohnehin stärkeren kathodennahen Banden zu erkennen waren.

PGM

Die Häufigkeit seltener Allele am Locus PGM_1 wird von Spencer et. al. mit 1,16 heterozygoten Fällen auf 1000 Beobachtungen angegeben (22) .

In der vorliegenden Untersuchung fanden sich unter 376 Proben viermal atypische Isoenzymmuster der PGM_1 , das entspricht 1,1 %.

In diesen vier Fällen zeigte jeweils nur das die a-Bande am Locus PGM_1 bildende Isoenzym erkennbare Aktivität. Die Blutproben stammten von Kindern, die an ALL erkrankt waren. Drei der Kinder standen zum Zeitpunkt der Blutentnahme unter cyto-statischer Behandlung.

E. Monn beschrieb 1969 (37), daß beim Vorliegen einer abnorm hohen Anzahl unreifer roter Blutkörperchen oder Leukozyten im Blut die kathodennahen Banden der verschiedenen PGM -Phänotypen eine relativ größere Intensität aufwiesen als die weiter anodenwärts gelegenen. Vielleicht ist dieses Phänomen für die beschriebenen vier Fälle verantwortlich zu machen; die schwach ausgeprägten c-Banden eines Typs PGM_1^1 könnten bei der Auswertung übersehen worden sein. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, daß es sich bei den gefundenen atypischen Varianten um heterozygote Formen der seltenen Allele PGM_1^0 bzw. PGM_1^r ("reduced") handelte (7, 14 , 15), und daß wegen der verminderten PGM_1 - Aktivität nur die kathodennahe a-Bande zu erkennen war, die, wie beschrieben, bei einer abnorm hohen Blutzellzahl eine größere Intensität aufweist (37) .

6-PGD

Im Untersuchungsgut der Probanden aus Westungarn zeigten drei Proben, die alle von

derselben Patientin stammten, ein ungewöhnliches Isoenzymmuster der 6-PGD. Die Probandin stand wegen Lymphogranulomatose unter cytostatischer Behandlung; das bei ihr vorliegende 6-PGD-Bandenmuster war schon durch frühere Untersuchungen bekannt (2, 19) und als atypische Richmond-Variante bezeichnet worden.

Werden diese drei Proben als ein Fall unter 379 untersuchten Proben gewertet, so läßt sich die Häufigkeit atypischer Varianten der 6-PGD auf 0,26 % schätzen, während Smith et. al. 1971/72 die Häufigkeit seltener Allele bei der 6-PGD mit 0,2 auf 1000 Beobachtungen angaben (22) .

Die beiden ersten, im März und Juni 1976 entnommenen Blutproben dieser Patientin zeigten bei der Auftrennung der 6-PGD jeweils zwei Isoenzymbanden. Die langsamere Bande ähnelte in Lage und Intensität derjenigen eines Typs 6-PGD AA. Es war jedoch noch ein schneller anodisch wanderndes Isoenzym zu sehen, das eine etwa gleichstarke Bande bildete. Bei der Untersuchung der dritten Blutprobe der Patientin im Dezember 1976 war nur noch eine einzige Isoenzymbande zu erkennen, die der weiter anodenwärts gelegenen Bande des beschriebenen Isoenzymmusters entsprach (siehe Teil "Eigene Ergebnisse, Seite 54) . Leider konnte dieser Befund nicht durch die Untersuchung einer weiteren

Blutprobe nachgeprüft werden, da die Patientin inzwischen verstorben war.

In der Literatur wurden mehrfach außergewöhnliche 6-PGD-Phänotypen vorgestellt, die schneller wandernde Isoenzyme aufwiesen als die Normphänotypen. Die hier beschriebene atypische Variante hat Ähnlichkeit mit den im folgenden aufgeführten seltenen 6-PGD-Phänotypen :

Die Richmond-Variante, die zuerst 1966 von Parr beschrieben wurde, ist die heterozygote Form des Allels 6-PGD R mit dem Normgen 6-PGD A (40) . Sie weist drei Enzymbanden auf; die am weitesten anodisch gelegene Bande ist nur sehr schwach ausgeprägt.

Das Gen 6-PGD Bombay kontrolliert zusammen mit dem Normgen 6-PGD A die Variante 6-PGD Bombay. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Isoenzyme vom Typ 6-PGD Bombay ähnelt der des Typs 6-PGD Richmond; die mittlere und langsamste Bande sind etwa gleich stark ausgeprägt, während die am schnellsten wandernde Bande normalerweise kaum zu sehen ist (3) .

1970 beschrieb Tariwerdian einen bislang noch nicht beobachteten Phänotyp der 6-PGD, der außer der "normalen" Enzymbande eines Typs 6-PGD A eine schneller wandernde Fraktion aufwies: dieser neue Phänotyp ist die heterozygote Form eines seltenen Allels,

das den Namen 6-PGD Freiburg erhielt, und
des Normgens 6-PGD A (62) .

Es ist nicht möglich, die gefundene 6-PGD-Variante aus Westungarn eindeutig einem dieser seltenen 6-PGD Phänotypen zuzuordnen, da sie nur zwei, in einem Fall sogar nur eine Isoenzymbande aufwies. Eine Richmond-Variante mit herabgesetzter Enzymaktivität könnte jedoch am ehesten ein derartiges Bandenmuster zeigen, bei dem aufgrund des Aktivitätsverlustes der 6-PGD nur zwei bzw. eine der stärker ausgeprägten Banden zu sehen ist. Auch hier muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß die Grunderkrankung oder die Anwendung cytotoxischer Medikamente die Enzymaktivität beeinflußt haben könnte.

3. Beantwortung der Fragestellung

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse lassen sich die am Anfang dieser Arbeit gestellten Fragen folgendermaßen beantworten:

Im Vergleich zu den in der Literatur angegebenen Häufigkeitszahlen für das Vorkommen seltener Allele bei den vier untersuchten Enzymsystemen weisen die Patienten, die an malignen Neubildungen erkrankt waren, etwa 10 bis 50 mal häufiger atypische Isoenzymmuster auf. Wegen der geringen Fallzahlen kann dieser Wert jedoch nur als eine sehr grobe Schätzung betrachtet werden. Unterschiede in der Häufigkeit des Auftretens außergewöhnlicher Isoenzymmuster zwischen cytostatisch behandelten Patienten und solchen, die zum Zeitpunkt der Blutentnahme nicht mit cytotoxischen Medikamenten behandelt wurden, konnten bei den geringen Fallzahlen nicht eindeutig festgestellt werden: insgesamt traten in 15 Fällen bei 13 verschiedenen Patienten atypische Varianten auf; von diesen Probanden standen 10 unter cytostatischer Behandlung.

Signifikante Unterschiede zwischen den Genfrequenzen "gesunder" und "kranker" Probanden wurden bei der 6-PGD im Untersuchungsgut der Probanden aus Franken und bei der PGM im Untersuchungsgut der Probanden aus Franken und Westungarn festgestellt.

VII. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mittels Cellulose-Acetatfolien-Elektrophorese die Erythrozytenenzymssysteme der Adenosindeaminase, der Adenylatkinase, der Phosphoglucumutase und der 6-Phosphogluconatdehydrogenase von Probanden aus Westungarn und Franken dargestellt, die an malignen Neubildungen erkrankt waren und zu einem überwiegenden Teil mit cytotoxischen Medikamenten behandelt wurden. Die gewonnenen Daten wurden mit denen eines Kollektivs von früher untersuchten Spendern verglichen, die nicht an bösartigen Neubildungen erkrankt waren. Ziel der Arbeit war es, festzustellen, ob bei den Malignompatienten gehäuft atypische Varianten in den vier Erythrozytenisoenzymsystemen auftraten. Ferner wurde versucht, etwaige Unterschiede zwischen den in der Literatur angegebenen Genfrequenzen und denen des hier untersuchten Krankenguts aufzudecken. Wegen der zu geringen Fallzahlen ließ sich eine Häufung von seltenen Varianten nicht statistisch sichern; in dem untersuchten Krankengut traten aber etwa 10 bis 50 mal häufiger atypische Isoenzymmuster auf, als in der Literatur angegeben wird. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den in der Literatur angegebenen Genfrequenzen und den in dieser Arbeit ermittelten ergaben sich bei der 6-PGD im Untersuchungsgut der Probanden aus Franken und bei der PGM im Untersuchungsgut der Probanden aus Franken und Westungarn.

VIII. Literaturverzeichnis

1. Adamek H., G.-W. Orth: Die Isoenzym-
morphismen. Saure Erythrocytenphosphatase,
Phosphoglucomutase, Adenylatkinase und
Adenosindeaminase.
Ärztl. Lab. 17, 132 (1971)
2. Arnold, E.; F. C. Sitzmann; H. Gailer;
L. Istvan; H. Kaloud; I. Teubl:
Vergleichende Untersuchungen zum Polymor-
phismus von Erythrozytenenzymen in Franken
und in Westungarn. Wiener klinische Wochen-
schrift 90, (8) , 270 (1978)
3. Blake, N.M.; N. Saha, E. M. McDermid, R.L.
Kirk: Additional Electrophoretic Variants
of 6-Phosphogluconate Dehydrogenase. Hum.
Gen. 21, 347 (1974)
4. Bowman, J. E.; P. E. Carson, H. Frischer:
Genetics of starch-gel electrophoretic
variants of human 6-phosphogluconic
dehydrogenase: Population and family studies
in the United States and in Mexico.
Nature 210, 811 (1966)
5. Bowman, J. E.; H. Frischer: Population,
family and biochemical investigation of
human adenylate kinase polymorphism.
Nature 214, 1156 (1967)

6. Brinkman, B.; H. H. Hoppe: Red cell enzyme polymorphism in a northern German population. Hum. Hered. 21, 278 (1971)
7. Brinkman, B. ; E. Kooops: Inherited partial deficiency of the PGM₁ gene, biochemical and densitometric studies. Ann. hum. Genet. 35 , 363 (1972)
8. Carson, P. E.; F. Ajmar; F. Hashimoto; J.E. Bowman: Electrophoretic demonstration of stromal effects on haemolysate glucose-6-phosphate-dehydrogenase and 6-phosphogluconate-dehydrogenase. Nature (Lond.) 210, 813 (1966)
9. Carter, N. D.; R. A. Fildes: Genetically determined electrophoretic variations of human phosphogluconate dehydrogenase. Acta Genet. (Basel), 18 , 109 (1968)
10. Chen, S. H.; C. R. Scott; E. R. Giblett: Adenosine deaminase: Demonstration of a "silent" gene associated with combined immunodeficiency disease. Amer. J. Hum. Genet. 26 , 103 (1974)
11. Davidson, R. G. : Electrophoretic variants of human 6-phosphogluconate dehydrogenase: population, family studies and description of a new variant. Ann. Hum. Genet. 30 , 355 (1967)

12. Detter, J. C.; G. Stamatoyannopoulos:
Adenosine deaminase: racial distribution
and report of a new phenotype. J. med.
Genet. 7, 356 (1970)

13. Dissing, J.; J. B. Knudsen: A new red cell
adenosine deaminase phenotype in man.
Hum. Hered. 19, 375 (1969)

14. Fiedler, H.; H. Pettenkofer: Ein "neuer"
Phänotyp im Isoenzymsystem der Phospho-
glucomutase des Menschen (PGM_1^0).
1. Mitt. Blut 18, 33 (1968)

15. Fiedler, H.; H. Pettenkofer: 2. Mitt. Blut
18, 358 (1969)

16. Fildes, R. A. u. H. Harris: Genetically
determined variation of Adenylate Kinase in
Man. Nature (Lond.) 209, 261 (1966)

17. Fildes, R. A. u. H. Harris: "Secondary
isozymes" derived from the three PGM loci.
Ann. Hum. Genet. (Lond.) 36, 69 (1972)

18. Fildes, R. A. u. C.W. Parr: Human red cell
phosphogluconate dehydrogenases. Nature
(Lond.) 200, 890 (1963)

19. Gailer, H.; Arnold, E.; F. C. Sitzmann;
L. Istvan; H. Kaloud; I. Teubl: Vergleichende
Untersuchungen zum Polymorphismus von Ery-
throzytenenzymen in Franken und in Westungarn.
Wiener klinische Wochenschrift 90 (8),
270 (1978) (Siehe Nr. 2)

20. Goedde, H. W.; H.-G. Benkmann: Frequencies of red cell adenosine deaminase, adenylate kinase, phosphoglucomutase, acid phosphatase and serum-alpha-antitrypsine in a German population. Hum. Genet. 10 , 235 (1970)
21. Greene, J. M. ; D. M. Dawson: "Altered electrophoretic mobility of oxidized phosphoglucomutase. Ann. Hum. Genet. (Lond.) 36 , 355 (1973)
22. Harris, H. ; D. A. Hopkinson; E. B. Robson: The incidence of rare alleles determining electrophoretic variants: data on 43 enzyme loci in man. Ann. Hum. Genet. (Lond.), 37, 237 (1974)
23. Hopkinson, D. A. ; P. J. L. Cook: Further data on the adenosine deaminase polymorphism and a report of a new phenotype. Ann. Hum. Genet. 32, 361 (1969)
24. Hopkinson, D. A.; H. Harris: Evidence for a second "structural" locus determining human phosphoglucomutase. Nature (Lond.) 208, 410 (1965)
25. Hopkinson, D. A.; H. Harris: Rare phosphoglucomutase phenotypes. Ann. Hum. Genet. 30, 167 (1966)
26. Hopkinson, D. A.; H. Harris: A third phosphoglucomutase locus in man. Ann. Hum. Genet. 31, 359 (1968)

27. Hopkinson, D.A.; H. Harris: The investigation of reactive sulphhydryls in enzymes and their variants by starch gel electrophoresis. Studies on red cell adenosine deaminase. Ann. Hum. Genet. 33, 81 (1969)
28. Hopkinson, D. A.; H. Harris: Recent work on isozymes in man. Ann. Rev. Genet. 5, 5 (1971)
29. Hummel, K.; G. Pulverer: Häufigkeit der Sichttypen in den Erbsystemen Hp, Gc, SEP, PGM und AK bei Deutschen (Freiburg/Br.; Köln) und bei Türken. Hum. Genet. 8, 33 (1970)
30. Jenkins Trefor; G. T. Nurse: The red cell 6-phospho-gluconate-dehydrogenase polymorphism in certain Southern African populations; with the first report of a new phenotype. Ann. Hum. Genet. (Lond.) 38, 19 (1974)
31. Kazazian, H.H.: Molecular size studies on 6-phospho-gluconate dehydrogenase. Nature (Lond.) 212, 197 (1966)
32. Kühnl, P. ; U. Schmidtman; W. Spielmann: Evidence for Two Additional Common Alleles at the PGM₁- locus (Phosphoglucomutase-E. C. 2.7.5.1) .Humangenetik 35, 219 (1976)

33. Mayr, W. R.; V. Pausch: Die Adenylatkinase-gruppen. *Ärztl. Labor* 16, 53 (1970)
34. McAlpine, P.J.; D. A. Hopkinson:
Thermolability studies on the isozymes of human phosphoglucomutase. *Ann. Hum. Genet.* 34, 61 (1970)
35. McAlpine, P.J.; D.A. Hopkinson: The relative activities attributable to three phosphoglucomutase loci in human tissues. *Ann. Hum. Genet.* 34, 169 (1970)
36. McAlpine, P.J.; D. A. Hopkinson: Molecular size estimates of the human phosphoglucomutase isozymes by gel filtration chromatography. *Ann. Hum. Genet.* 34, 177 (1970)
37. Monn, E.: Application of the phosphoglucomutase system of human red cells in paternity cases. *Vox Sang.* (Basel) 16, 211 (1969)
38. Najjar, V. A. ; M. E. Pullmann: The occurrence of a group transfer involving enzyme (PGM) and substrate. *Science* 119, 631 (1954)
39. Op't Hof J.; U. Wolf: Zur Populationsgenetik der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Genhäufigkeit in einer südwestdeutschen Stichprobe. *Hum. Genet.* 6, 338 (1968)

40. Parr, C. W.: Erythrocyte phosphogluconate dehydrogenase polymorphism. Nature (Lond.) 210, 487 (1966)
41. Parr, C. W.; L. J. Fitch: Inherited quantitative variations of human phosphogluconate dehydrogenase. Ann. Hum. Genet. 30, 339 (1967)
42. Radam, G.; H. Strauch: Populationsgenetik der Adenylatkinase. Hum. Genet. 6, 90 (1968)
43. Radam, G.; H. Strauch: Daten zur Populationsgenetik der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase. Hum. Genet. 13, 61 (1971)
44. Radam, G.; H. Strauch; O. Prokop: Ein seltener Phänotyp im Adenosindeaminase-Polymorphismus: Hinweis auf die Existenz eines neuen Allels. Hum. Genet. 25, 247 (1974)
45. Rapley, S.; E. B. Robson: Data on the incidence segregation and linkage relations of the adenylate kinase polymorphism. Ann. Hum. Genet. 31, 237 (1967)
46. Renninger, W.; Ch. Bimboese: Zur Genetik der Erythrocyten-Adenosin-Deaminase. Hum. Genet. 9, 34 (1970)
47. Ritter, H.; G.G. Wendt: Genetics and linkage analysis on Adenosine deaminase. Hum. Genet. 14, 69 (1971)

48. Ropers, H.; J. Op't Hof: On the genetic interpretation of the 6-phosphogluconate-dehydrogenase-isoenzymes in man. Vox. Sang. (Basel) 18, 244 (1970)

49. Schaal, K.P.; J.Graf; V. Weidtman; G. Pulverer: Verteilung der Isoenzymentypen der Erythrocyten-Phosphoglucomutase in der deutschsprachigen Bevölkerung. Z. Immun. Forsch. 141, 391 (1971)

50. Shih, L. ;P. Justice; D.Y.-Y. Hsia: Purification an characterization of genetic variants of 6-phospho-gluconate-dehydrogenase. Biochem. Genet. 1, 359 (1968)

51. Singer, J.D.; D.J.H.Brock: Half-normal adenylate kinase activity in three generations. Ann. Hum. Genet. (Lond.) 35, 109 (1971)

52. Sonneborn, H.-H.: Die Bestimmung der erythrocytären Enzym polymorphismen Adenosin-deaminase (ADA), Adenylatkinase (AK), Phosphoglukomutase (PGM) und 6-Phospho-gluconat-Dehydrogenase (6-PGD) mit der Celluloseacetatfolien-Elektrophorese. Broschüre der Fa. Biotest Serum-Institut GmbH Frankfurt.

53. Sonneborn, H.-H.: Gleichzeitige Auftrennung von AK und ADA-Isoenzymen auf einer Folie. Hum.Genet. 15, 87 (1972)

54. Sonneborn, H.-H.: Comments on the Determination of isoenzyme polymorphism (ADA, AK, 6-PGD, PGM) by cellulose acetate electrophoresis. Hum. Genet. 17, 49 (1972)
55. Sonneborn, H.-H.; W. Renninger: Genfrequenzuntersuchungen der Adenosindeaminase-Isoenzyme mit einer neuen Technik. Hum. Genet. 10, 188 (1970)
56. Sonneborn, H.-H.; W. Renninger: Adenylatkinase-Untersuchung. Eine populationsgenetische Untersuchung mit Celluloseacetatfolien-Elektrophorese. Ärztl. Lab. 17, 54 (1971)
57. Spencer, N.; D. A. Hopkinson; H. Harris: Phosphoglucomutase polymorphism in man. Nature 204, 742 (1964)
58. Spencer, N.; D. A. Hopkinson; H. Harris: Adenosine deaminase polymorphism in man. Ann. Hum. Genet. (Lond.) 32, 9 (1968)
59. Swallow, D. M.; L. Evans; D. A. Hopkinson: Several of the adenosine deaminase isozymes are glycoproteins. Nature (Lond.) 269, 261 (1977)
60. Szeinberg, A.; S. Garendo: Erythrocyte adenylate kinase deficiency. Lancet 1969 I, 315.

61. Tariwerdian, G.; H. Ritter: Population genetics of adenosine deaminase gene frequencies in south western Germany. Hum. Genet. 7, 179 (1969)
62. Tariwerdian, G.; H. Ropers; J. Op't Hof; H. Ritter: Zur Genetik der 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (E. C. : 1.1.1.44) Eine neue Variante F (Freiburg) . Humangenetik 10, 355 (1970)
63. Tills, D.; van den Branden: The world distribution of electrophoretic variants of the red cell enzyme adenylate kinase. Hum. Hered. 20, 517 (1970)
64. Tills, D.; van den Branden: The distribution in man of genetic variants of 6-phosphogluconate-dehydrogenase. Hum. Hered. 20, 523 (1970)
65. Wilson, D. E., Jr.; S. Povey; H. Harris: Adenylate kinase in man: evidence for a third locus. Ann. Hum. Genet. (Lond.) 39, 305 (1976)

D a n k s a g u n g

Herrn Professor Dr. med. F. C. Sitzmann
danke ich für die Überlassung des Themas
und seine Hilfe und Ratschläge bei der
Bearbeitung.

Herrn Professor Dr. med. A. Windorfer
danke ich für die Bereitstellung des
Arbeitsplatzes im Labor der Kinderklinik
der Universität Erlangen.

Den Herren Dr. Günselmann und Dr. Prestele
vom Institut für Medizinische Statistik
und Dokumentation (Vorstand: Prof. Dr. L.
Horbach) in Erlangen danke ich für ihre
Hilfe bei der Erstellung des statistischen
Teils der Arbeit.

Lebenslauf

Am 23. Januar 1954 wurde ich als zweites Kind des Regierungsbaumeisters Karlheinz Weiskopf und seiner Ehefrau Elli Weiskopf, geb. Schneider in Kulmbach geboren.

Von 1960 bis 1962 besuchte ich die Volksschule in Kulmbach, von 1962 bis 1964 die Luitpoldschule in Bayreuth. Hier trat ich 1964 in das Humanistische Gymnasium ein, wo ich den neusprachlichen Zweig wählte und darin 1973 die Reifeprüfung ablegte.

Im Wintersemester 1973/74 begann ich mein Medizinstudium an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen. Das Physikum bestand ich im August 1975. Medizinisches Staatsexamen im August 1976, 1978 und im Oktober 1979.

Uta Weiskopf

